

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representation of  
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :

C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 97/04118

(43) Date de publication internationale:

6 février 1997 (06.02.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01122

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 1996 (17.07.96)

(30) Données relatives à la priorité:

95/08616

17 juillet 1995 (17.07.95)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE  
PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place  
Jussieu, F-75252 Paris Cédex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KLATZMANN, David  
[FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris (FR). SALMON,  
Patrick [FR/FR]; Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83, Boulevard  
de l'Hôpital, F-75651 Paris Cédex 13 (FR). BOYER,  
Olivier [FR/FR]; Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83, Boulevard de  
l'Hôpital, F-75651 Paris Cédex 13 (FR).(74) Mandataire: ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD  
S.A.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: CD4 GENE REGULATORY SEQUENCES SPECIFICALLY EXPRESSED IN MATURE T CELLS

(54) Titre: SEQUENCES REGULATRICES ISSUES DU GENE CD4 ET A EXPRESSION SPECIFIQUE DANS LES LYMPHOCYTES  
T MATURES

(57) Abstract

An expression system for a protein or heterologous gene including a recombinant vector, for use in transducing haematopoietic line cells and particularly stem cells, whereby the transduced cell expresses the protein or heterologous gene only in mature T cells after repertory selection, said vector being provided with all the sequences required for its expression, and characterised in that it contains at least one amplifier for a CD4 gene of the same or another species.

(57) Abrégé

Système d'expression d'une protéine ou d'un gène hétérologue comprenant un vecteur recombinant, utilisable pour la transduction de cellules de la lignée hématopoïétique, notamment les cellules souches, de sorte que ladite cellule ainsi transduite n'exprimera la protéine ou le gène hétérologue que dans les cellules T matures après la sélection du répertoire, ledit vecteur étant pourvu de toutes les séquences nécessaires à son expression, et caractérisé en ce qu'il contient au moins un amplificateur d'un gène CD4 de même espèce ou d'espèce différente.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**SEQUENCES REGULATRICES ISSUES DU GENE CD4 ET A  
EXPRESSION SPECIFIQUE DANS LES LYMPHOCYTES T  
MATURES.**

5           La présente invention est relative à l'utilisation de séquences  
régulatrices issues du gène CD4 dans des vecteurs d'expression d'un  
gène hétérologue ou d'un transgène, leur conférant, quand ils sont  
intégrés dans des cellules du système hématopoïétique et notamment  
10 les cellules souches, ou plus généralement les cellules de la moelle  
osseuse, une expression spécifique au niveau des lymphocytes T  
matures à l'exclusion des lymphocytes T immatures, et notamment  
après la sélection du répertoire.

          Au cours de la maturation des cellules T, l'expression des  
récepteurs CD4 et CD8 répond à un mécanisme complexe de  
15 régulation ; l'expression différentielle des glycoprotéines CD4 et CD8  
est couplée au choix de l'une des voies de la différenciation soit en  
lymphocytes T auxiliaires soit en lymphocytes T cytotoxiques ; ainsi les  
thymocytes, c'est-à-dire les cellules hématopoïétiques engagées dans  
une voie de différenciation T, ont tout d'abord un phénotype CD4- CD8-  
20 (doubles négatifs ou DN), puis ils acquièrent l'expression conjointe de  
la molécule CD4 et de la molécule CD8 pour former les thymocytes  
doubles positifs (DP) CD4+ CD8+ et enfin, cette population se  
différencie en lymphocytes simples positifs (SP) qui expriment soit CD4  
pour les lymphocytes T auxiliaires soit CD8 pour les lymphocytes T  
25 cytotoxiques. Les thymocytes qui se lient aux molécules  
d'histocompatibilité de classe I deviendront des lymphocytes T  
cytotoxiques CD4- CD8+, alors que ceux qui se lient aux molécules de  
classe II deviendront des lymphocytes T auxiliaires CD4+ CD8- ; après  
ce processus intra-thymique de sélection du répertoire, les thymocytes  
30 quittent le thymus et atteignent le système périphérique : sang et  
organes lymphoïdes.

Une synthèse de ce processus de différenciation est décrite dans Nicolic-Zugic, J, (1991) Immunol. Today 12 : 65-70.

La régulation de l'expression du gène CD4 est actuellement étudiée par de nombreuses équipes, l'élucidation d'un tel mécanisme pouvant aider à la compréhension du contrôle des développements des cellules T.

Plusieurs équipes travaillent sur les séquences régulatrices du gène CD4 humain ou murin. Parmi les plus récents, il convient de citer les travaux suivants : Killeen et al (EMBO Journal vol 12 n°4 p1547, 1993) ont montré qu'un transgène portant le CD4 humain d'une taille d'environ 35 kb possédait toutes les séquences génomiques nécessaires au contrôle de l'expression au cours du développement dans des souris transgéniques. Dans ce fragment, deux éléments de régulation distincts ont été identifiés comme critiques pour l'expression du transgène : le premier est une séquence amplificatrice, ou amplificateur (pour enhancer), située soit 13 kb en amont du site cap du CD4 murin, soit 6 kb en amont du CD4 humain. Blum M.D. et al (J. Exp. Med. (1993) 177 n° 5 : 1343-1358) ont identifié et séquencé l'amplificateur du CD4 humain, et Sawada et al. (Mol. Cell. Biol; 11 55: 5506-5515, 1991) ont identifié et séquencé l'amplificateur du CD4 murin. Ces deux équipes ont montré que l'expression de cette amplificateur est spécifique du gène CD4 dans les lymphocytes T, qu'ils soient matures ou immatures ; P. Salmon et al, (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90 : 7739-7743 (1993)) ont analysé la structure et la séquence du promoteur du CD4 humain et l'ont comparé avec celui du CD4 murin. Ils ont identifié un fragment d'environ 1100 paires de bases présentant la fonction de promoteur spécifique du CD4. Un alignement de cette séquence avec celle du promoteur CD4 murin indique une structure très similaire comme le montre la figure 1 de ce même article.

La différenciation des lymphocytes T met en oeuvre d'autres éléments de régulation de type silencier (silencer) dont la présence

conduit à la diminution ou à l'arrêt de la transcription des gènes quand ils sont dans leur voisinage. Sawada et al, dans Cell 77 : 911-929, (1994) ont mis en évidence l'existence d'un silenceur dans un premier intron du gène CD4, et dont une des fonctions est l'extinction de la transcription du gène CD4 dans les lymphocytes T matures CD8+.

Enfin le gène du CD4 humain a été analysé par Z. Hanna et al. (Mol. and Cell. Biology (1994) p. 1084-1094) dans une construction qui comprend au moins 3 introns d'une longueur totale de 12Kb.

Toutes les études récentes, citées plus haut, indiquent que l'expression du gène CD4 est contrôlée de manière similaire dans les cellules humaines et murines ; néanmoins les relations entre les différents éléments de régulation et leurs fonctions n'est pas élucidées.

La présente invention résulte de la découverte faite par les inventeurs d'une combinaison de séquences régulatrices qui présentent des propriétés inattendues et totalement imprévisibles : cette combinaison composée d'éléments génétiques issus des séquences en 5' du gène CD4, le cas échéant combinés avec le cDNA du gène CD4, a son expression restreinte aux cellules T matures et aux cellules NK dans un modèle de souris transgénique ; aucune expression n'a pu être détectée dans les cellules T immatures incluant les thymocytes doubles positifs ou doubles négatifs. Cet ensemble de séquences régulatrices est le premier à avoir cette spécificité d'expression ce qui est particulièrement important notamment pour une utilisation dans le cadre de la thérapie génique, pour des programmes qui nécessiteraient l'expression spécifique d'un gène dans les lymphocytes T matures.

Rien, dans l'état de la technique, ne laissait supposer qu'une telle combinaison pouvait conduire à ce résultat.

La présente invention résulte de la découverte selon laquelle la combinaison de l'amplificateur et du promoteur de CD4 promeut l'expression d'un gène « reporter », en l'occurrence le cDNA du gène

CD4 humain, dans des thymocytes matures de souris alors qu'il n'est pas exprimé dans des doubles positifs CD4+ CD8+ immatures ; ce résultat est surprenant en ce sens qu'il implique l'existence d'un élément de régulation supplémentaire non encore connu et qui permettrait l'expression du gène CD4 au stade immature ; cet élément qui agirait en « cis » serait absent de la construction puisqu'aucun élément de régulation de la souris qui pourrait agir en trans n'est efficace pour une telle expression dans les cellules immatures.

Un résultat prévisible est que l'association à cette combinaison du silenceur décrit par Sawada et al, 1994 (voir supra) constitue une cassette d'expression d'un gène hétérologue exclusivement dans les cellules T auxiliaires SP CD4+ CD8-.

La présente invention porte sur un système d'expression d'une protéine ou d'un gène hétérologue comprenant un vecteur recombinant, utilisable pour la transduction des cellules de la lignée hématopoïétique, notamment les cellules souches du sang ou de la moelle, de telle façon que la cellule ainsi transduite n'exprimera la protéine ou le gène hétérologue portée par le vecteur que dans les cellules T matures après la sélection du répertoire, et ce à l'exclusion d'une expression dans des cellules T immatures notamment les cellules CD4- CD8- et CD4+ CD8+ ; ledit vecteur du système d'expression est pourvu de toutes les séquences nécessaires à son expression et il est caractérisé en ce qu'il contient au moins un amplificateur d'un gène CD4 issu de la même espèce ou d'une espèce différente.

Le vecteur du système d'expression peut contenir également, combiné à l'amplificateur, un promoteur constitué de l'une des séquences suivantes :

- le promoteur du gène CD4 humain tel que représenté dans la figure 6, ou



- la séquence comprise entre les nucléotides -496 et +16 dans la numérotation de P. SALMON (1993 supra) (figure 6), ou,
- la séquence comprise entre les nucléotides -165 et +16 (P. SALMON, 1993 supra) (figure 6) ou,
- toute séquence dérivée de l'une des séquences précédentes par addition, délétion ou substitution de nucléotides sans modification substantielle de l'expression de la protéine hétérologue sous le contrôle de ce promoteur.

Un exemple particulier d'amplificateur performant dans le cadre de cette invention est celui du CD4 murin et constitué de 339 ou tout ou partie des 339 paires de bases et décrit dans Sawada et al (1991) cité plus haut, cet amplificateur pouvant être présent soit sous forme d'une séquence simple soit sous forme d'une séquence répétée de deux à cinq fois et dont la séquence est la suivante :

15	TGTTGGGGTT	CAAATTTGAG	CCCCAGCTGT	TAGCCCTCTG
	CAAAGAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAGAACAAA	GGGCCTAGAT
	TTCCCTTCTG	AGCCCCACCC	TAAGATGAAG	CCTCTTCTTT
	CAAGGGAGTG	GGGTGGGGT	GGAGGCGGAT	CCTGTCAGCT
	TTGCTCTCTC	TGTGGCTGGC	AGTTTCTCCA	AAGGGTAACA
20	GGTGTGAGCT	GGCTGAGCCT	AGGCTGAACC	CTGAGACATG
	CTACCTCTGT	CTTCTCATGG	CTGGAGGCAG	CCTTTGTAAG
	TCACAGAAAG	TAGCTGAGGG	GCTCTGGAAA	AAAGACAGCC
	AGGGTGGAGG	TAGATTGGT		

L'amplificateur du CD4 humain, décrit par M.D. Blum et al (cité plus haut) entre dans le champs de l'invention, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec le promoteur du CD4.

Par le terme amplificateur d'un gène CD4, on entend non seulement les séquences décrites par Sawada et al ou par Blum et al, mais également d'autres séquences dérivées d'autres espèces de mammifères et présentant un degré d'homologie suffisant avec les séquences ci-dessus comprenant notamment, par exemple, les

séquences spécifiques de protéines nucléaires CD4-1, CD4-2 et CD4-3 décrits dans Sawada et al, (1991).

L'implication de cette propriété particulière - non expression dans les cellules T immatures, expression dans les cellules T matures - fait apparaître les avantages de la construction de l'invention pour son incorporation dans des médicaments utilisables en thérapie génique dans toutes les indications où l'expression de transgène dans les cellules T pourrait être un moyen pour traiter ou prévenir certaines pathologies ou dysfonctionnements notamment les infections virales, notamment par le VIH, des pathologies de l'expression de certains gènes dans des lymphocytes T par exemple le déficit en adénosine désaminase ou plus généralement les déficits immunitaires, primitifs ou secondaires, les pathologies auto-immunes ou les greffes. Cependant le thérapeute se heurte à une difficulté qui est la suivante : si les lymphocytes T matures sont pris comme cibles en thérapie génique, il est obligé de réaliser un transfert de gènes dans ces lymphocytes T matures ex vivo et ces derniers doivent être au préalable mis en culture pour effectuer ce transfert par les vecteurs appropriés ; après réinjection leur demi-vie est relativement courte ; au contraire si on choisit comme stratégie de cibler les cellules souches hématopoïétiques qui donnent naissance après différenciation aux lymphocytes T on se heurte alors à deux problèmes différents : le premier est celui de l'expression du gène d'intérêt dans les cellules souches qui n'est pas toujours souhaitable, et le deuxième est celui de la perturbation possible induite par l'expression du gène hétérologue dans les cellules immatures sur la sélection du répertoire dans le thymus.

La construction de l'invention permet de surmonter ce double inconvénient par un transfert aux cellules souches hématopoïétiques d'un gène hétérologue qui ne sera exprimé que postérieurement à la sélection du répertoire.

Le transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques a comme il a été dit plus haut été envisagé pour l'expression d'une protéine d'intérêt de type adénosine désaminase dans les lymphocytes T matures pour lesquels le traitement actuel est la transduction de lymphocytes T en culture prélevés par leucophérèse, par un vecteur rétroviral recombinant (pour une synthèse de ces essais voir Anderson W.F. Human Gene Therapy, Science (1992), 256 : 803-814).

Un autre type d'application du transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques est représenté par les infections virales graves (SIDA) ou la prévention de la stimulation immunitaire de type maladies auto-immunes ou GVHD (graft versus host disease). L'approche consiste à piéger les lymphocytes T en y incorporant un transgène constitué d'un gène suicide, par exemple la thymidine kinase de HSV1 (HSV1-TK) ou un équivalent fonctionnel de ce gène dont le produit d'expression peut métaboliser in situ une substance pharmaceutiquement inactive en un dérivé toxique pour induire spécifiquement la destruction de ces cellules, et dont un exemple dans le cas de l'HSV1-TK est le ganciclovir.

L'obtention de vecteurs d'expression ayant les qualités d'expression spécifiques des vecteurs de l'invention permet de surmonter les inconvénients cités plus haut des transferts dans les cellules souches ou dans les cellules matures.

Les vecteurs utilisables pour un transfert de gènes dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et susceptibles d'incorporer les éléments de régulation de l'invention permettant l'expression spécifique du gène étranger exclusivement dans les cellules matures, peuvent être choisis parmi tous les vecteurs appropriés à la transfection de ces CSH. Il s'agit essentiellement des vecteurs viraux, de type ad'novirus ou adéno associated virus (AAV), des vecteurs rétroviraux ou encore des systèmes non biologiques de délivrance in vivo d'acide nucléique. Une synthèse des caractéristiques essentielles

de ces différents types de vecteurs pourra être trouvée dans :  
« Thérapie génique, Edition John Libbey, (1993) pages 3 à 33 ».

Des vecteurs rétroviraux particuliers ont été décrits pour piéger les cellules T soit à l'égard d'infection par les rétrovirus, soit pour induire une tolérance du GVHD, et décrits dans les demandes de brevets n° W093/08843, W093/08844, W093/13824 et la demande de brevet français n° 9401994, dont les contenus sont incorporés par référence à la présente demande.

Dans le système d'expression de l'invention, dont le vecteur d'expression contient une cassette constituée du promoteur ou de la combinaison amplificateur/promoteur décrite plus haut, la protéine hétérologue susceptible d'être exprimée dans les lymphocytes T matures peut être choisie comme une protéine présentant une toxicité conditionnée par la présence d'une substance : la protéine hétérologue pouvant être avantageusement la thymidine kinase de HSV1-TK ou une protéine dérivée de celle-ci à partir du moment où elle conserve la caractéristique fonctionnelle, et un analogue de nucléosides tel l'aciclovir ou le ganciclovir susceptible d'être incorporé dans l'ADN en divisions après phosphorylation par la thymidine kinase et d'entraîner la mort du lymphocyte T mature.

Des exemples de constructions permettant la mise en oeuvre de cette approche « gène suicide » dans les lymphocytes T-CD4+ par transfection d'un gène HSV1-TK et traitement par le ganciclovir ont été décrits dans Caruso M. et Klatzmann D. (Proc. Natl. Acad. Sciences (1992) 89 : 182-186).

La présente invention est également relative à des cellules de la lignée hématopoïétique notamment des CSH transfectées par un vecteur d'expression constitué au moins d'une séquence codant pour une protéine hétérologue, d'un promoteur et d'une séquence de polyadénylation, caractérisés en ce que ledit vecteur contient au moins une séquence amplificatrice d'un gène CD4 de mammifère de même

espèce ou d'espèce différente, le cas échéant en combinaison avec un promoteur du gène CD4, la protéine hétérologue étant exprimée principalement dans les lymphocytes T matures issus de la sélection du répertoire.

- 5 De façon préférée le promoteur est constitué de l'une des séquences décrites plus haut constitué ou dérivé du promoteur du gène CD4 humain tel que représenté dans la figure 6.

Le promoteur peut également être un promoteur de cytokine ou d'un récepteur de cytokine comme celui de l'interleukine -2.

- 10 Dans les systèmes d'expression de l'invention, le vecteur d'expression contient, en amont ou en aval de la séquence à exprimer un amplificateur du CD4 murin, constitué de la séquence de 339 paires de bases décrites dans Sawada et al (1991). Un mode de réalisation est d'inclure entre 1 et 5 copies de cet amplificateur ou d'un  
15 amplificateur dérivé tel que défini plus haut et de préférence 3 copies.

- Les cellules transfectées par un vecteur recombinant exprimant une protéine qui présente une toxicité conditionnelle pour les cellules T matures font également partie de l'invention ; notamment les cellules transfectées par un vecteur portant la thymidine kinase de HSV1-TK ou  
20 une protéine dérivée de celle-ci fait partie de l'invention. Le gène de la thymidine kinase peut être alors sous la dépendance d'un promoteur tel que décrit ci-dessus ou d'un promoteur spécifique, notamment le promoteur de l'interleukine -2, de toute façon combiné avec un amplificateur tel que décrit ci-dessus. Il doit être rappelé ici que pour  
25 les lymphocytes T, l'activation est associée à la division cellulaire ; puisque le ganciclovir n'est toxique que pour les cellules en division et exprimant HSV1-TK, il n'est donc pas nécessaire d'avoir un contrôle extrêmement strict de l'expression du gène HSV1-TK au cours de l'activation cellulaire. Une expression restreinte aux lymphocytes T  
30 matures est suffisante ; en effet, même si un lymphocyte T mature quiescent exprime de façon constitutive la protéine HSV1-TK, même en

présence de ganciclovir, ce lymphocyte ne sera pas détruit. Au contraire dès que la cellule sera activée et se divisera, le ganciclovir triphosphate sera déjà présent dans la cellule et permettra d'éliminer celle-ci immédiatement.

5           La stratégie thérapeutique consistant à réaliser une greffe de moelle osseuse avec des cellules contenant un transgène HSV1-TK sous le contrôle des séquences régulatrices de l'invention présentera alors la sécurité requise de ne pas être exprimée pendant l'ensemble du processus de différenciation des lymphocytes T, et donc de ne pas  
10 perturber la sélection du répertoire, et de ne pas risquer de tuer des cellules en divisions permanentes que sont les thymocytes prématures. Enfin, et c'est le but recherché, le gène TK serait exprimé en permanence par tous les lymphocytes T. Dans le cas de la réinjection chez un patient de cellules souches de moelle osseuse, transduites  
15 avec TK, s'il apparaît une réaction du greffon contre l'hôte, qui implique l'activation de certains lymphocytes T du greffon reconnaissant des antigènes d'histocompatibilité du receveur, le système TK doit permettre l'élimination de ces lymphocytes grâce au traitement par le ganciclovir ou l'aciclovir.

20           La présente invention porte également sur l'utilisation de séquences régulatrices spécifiques du gène du CD4, notamment l'amplificateur, ou la combinaison de l'amplificateur et d'un promoteur tels que décrits plus haut, dans la fabrication d'un médicament utilisable en thérapie génique pour détruire spécifiquement les  
25 lymphocytes T activés, ces éléments de régulation étant intégrés dans un système d'expression susceptible de transformer les cellules du système hématopoïétique ; une telle utilisation permet d'envisager une expression spécifique du transgène incorporé dans le vecteur au niveau des cellules T matures CD4+ CD8- et CD4- CD8+, cette  
30 expression étant totalement réprimée pendant l'ensemble du processus

de différenciation jusque et y compris la sélection du répertoire dans le thymus.

Nous avons rappelé plus haut que Sawada et al dans Cell (1991) ont mis en évidence l'existence d'un silenceur transcriptionnel spécifique du gène CD4 et qui est localisé dans le premier intron du gène. La combinaison du silenceur ainsi caractérisée avec les séquences régulatrices de l'invention, qu'elles soient amplificateur seul ou amplificateur combiné à un promoteur, amplificateur et promoteur gardant les définitions ci-dessus, font partie de l'invention ainsi que leur utilisation dans la fabrication d'un médicament utilisable en thérapie génique pour transformer les cellules souches du système hématopoïétique. Une telle combinaison d'éléments de régulation dans un vecteur d'expression d'une protéine hétérologue permet d'envisager l'expression de cette protéine hétérologue exclusivement dans les lymphocytes T matures CD4+ CD8- à l'exclusion des lymphocytes T immatures et des lymphocytes T cytotoxiques CD8+.

L'utilisation d'un système d'expression comprenant les vecteurs munis des séquences régulatrices de l'invention est particulièrement recommandée dans la fabrication d'un médicament de thérapie génique pour prévenir ou traiter les rejets de greffes, les réactions de du greffon contre l'hôte, ou bien encore pour soigner les maladies auto-immunes ; elle est également envisageable pour préparer un médicament utilisable pour prévenir et traiter les infections par des virus, et notamment par le VIH. L'utilisation de la construction comprenant en outre un silenceur peut permettre de préparer des médicaments pour la thérapie génique.

En effet, les données disponibles à ce jour laissaient penser que la combinaison amplificateur/promoteur/silenceur du gène CD4 devrait être suffisante pour obtenir une expression dans toutes les cellules CD4+ (y compris DP) Or, comme décrit dans cette invention, il apparaît que la combinaison amplificateur/promoteur a clairement un caractère

innovant puisqu'elle entraîne une expression restreinte aux cellules T matures ; l'absence du silencieux n'intervient que dans l'expression dans les cellules CD8+ mais n'est pas liée au stade de développement.

Les exemples ci-après permettront d'illustrer les caractéristiques inattendues de la combinaison d'éléments régulateurs de l'invention et les propriétés qu'elle confère aux cellules dans lesquelles ils ont été intégrés.

L'homme du métier saura très facilement, à partir de la constatation décrite ici, adapter ensuite la construction qui devra être mise en oeuvre pour une prophylaxie ou une thérapeutique particulière qu'il voudrait mettre en oeuvre et nécessitant une expression spécifique dans les cellules T matures CD4+ CD8- et CD4- CD8+, ou uniquement dans les cellules T matures CD4+ CD8-.

Dans les exemples qui suivent les figures ont les légendes suivantes :

La figure 1A représente la cassette pCD4 constituée du promoteur du hCD4 de 1100 paires de bases, du cDNA du CD4 humain utilisé ici comme « reporter » et de la séquence de polyadénylation du virus SV40.

La figure 1B représente la cassette EpCD4 constituée de mêmes éléments que pCD4, pourvus en amont de 3 copies de la séquence de 339 paires de bases de l'amplificateur du CD4 de souris.

Dans les figures 1A et 1B, les lettres indiquent les sites de restriction avec les significations suivantes :

H = Hind3, S = Sph1, P = Pst1, X = Xba1, B = BamH1, E = Eco R1.

La figure 2 représente l'expression du gène reporter hCD4 à la surface des cellules mononuclées de la rate de souris transgéniques, respectivement les cellules SP CD4+, SP CD8+, lymphocytes  $\gamma\delta$ , lymphocytes B, macrophages et NK.

La figure 3 représente l'analyse de l'expression du gène reporter hCD4 dans les thymocytes de souris transgéniques par triple immuno-



marquage et cytométrie de flux. (A) représente la distribution des sous-populations de thymocytes définies par l'expression de mCD4 et mCD8. Les nombres dans chaque cadran représentent le pourcentage de chaque sous-population dans le thymus. (B) représente l'expression de hCD4 dans les cellules DN (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) ; DP (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) ; SP (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) et SP (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), respectivement.

Les nombres représentent le pourcentage de thymocytes hCD4<sup>+</sup> dans chaque sous-population pour les deux expériences présentes dans cette figure. Chaque résultat a été reproduit sept (lignée 7) et treize (lignée 10) fois lors d'expériences indépendantes.

La figure 4 représente l'analyse de l'expression de CD3, TCR  $\alpha\beta$  et TCR  $\gamma\delta$  dans les thymocytes DN qui expriment hCD4. Les thymocytes de souris transgéniques ont été marqués par un anticorps monoclonal hCD4 couplé QR, un mélange d'anticorps mCD4 et mCD8 couplés PE et soit (A) un anticorps TCR  $\alpha\beta$  ou TCR  $\gamma\delta$  couplé FITC. Le phénotype (A) des thymocytes DN et (B) des thymocytes DN qui expriment hCD4 ont été étudiés en réalisant une fenêtre sur les cellules PE<sup>-</sup> et QR+PE<sup>-</sup>, respectivement. Les résultats présentés dans cette figure sont représentatifs de cinq (lignée 10) et une (lignée 7) expériences reproductibles.

La figure 5 représente l'analyse de l'expression de hCD4 et HSA sur les thymocytes SP CD4. Les thymocytes SP CD4 ont été isolés par tri cellulaire, lavés, et ont subi un second immuno-marquage par les anticorps monoclonaux anti-HSA couplés PE et hCD4 couplés QR. L'expérience présentée a été reproduite trois (lignée 10) et une (lignée 7) fois lors d'expériences indépendantes.

La figure 6 représente la séquence du promoteur du gène codant pour le CD4 humain et extraite de P. Salmon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90 : 7739-7743 (1993)).

La figure 7 représente la caractérisation du silenceur du gène CD4 humain (Sil) permettant l'expression différentielle d'un transgène dans les lymphocytes T CD4+ matures et non dans les lymphocytes CD8+ matures.

- 5 La figure 8 représente la déplétion spécifique par le ganciclovir des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (figure 8a) en réponse à un mitogène (ConA) in vitro et (figure 8b) la déplétion in vivo des lymphocytes T exprimant un TCR V $\beta$ 7 en réponse à une stimulation par le super-antigène SEB.
- 10 La figure 9 représente les résultats de l'analyse de souris irradiées qui reçoivent une greffe de moelle osseuse accompagnée ou non de splénocytes provenant, soit de souris transgéniques, soit de souris normales. Les animaux contrôles qui ne sont pas greffés (GMO-) meurent des conséquences de l'irradiation. Les animaux qui sont
- 15 greffés avec une moelle osseuse seule sans splénocytes (GMO+) sont sauvés par la greffe de moelle osseuse, et il n'y a pas de GVH, comme cela est classique chez la souris. Les animaux recevant une greffe de moelle osseuse et des splénocytes allogéniques provenant, soit de souris transgéniques traitées avec le PBS (GVH/PBS), soit de souris
- 20 non transgéniques traitées avec le ganciclovir (GVH/GCV NTG) meurent également rapidement et présentent tous les signes cliniques et histologiques d'une GVH. Seules les souris ayant reçu de la moelle osseuse et des splénocytes de souris transgéniques et traitées par le ganciclovir (GVH/GCV) survivent également à la greffe de moelle, sans
- 25 signe histologique ni clinique de GVH.
- La figure 10 représente la caractérisation des séquences minimales permettant l'expression d'un transgène à partir des séquences régulatrices du gène CD4 humain.
- La figure 11 représente l'expression du gène rapporteur après
- 30 transfection des différentes constructions génétiques de la ligène 4 dans les cellules Jurkat.

**Exemple 1 : Expression d'un mini-gène CD4 humain dans les cellules T matures de souris transgéniques :**

Deux plasmides ont été construits :

- le plasmide pCD4 portant une séquence de 1100 paires de bases correspondant au promoteur CD4 humain, avec en aval le cDNA du CD4 humain et une séquence de polyadénylation du SV40 (Figure 1A),
- le plasmide EpCD4 qui est la même construction comportant en outre trois répétitions de l'amplificateur CD4 murin de 339 paires de bases décrit dans Sawada (1991) (figure 1B).

Le cDNA du CD4 appartient à ces constructions à titre de gène reporter c'est-à-dire dont on regarde l'expression ou la non expression dans le système de souris transgénique, l'expression étant facile à détecter par les techniques de cytométrie de flux utilisées.

**1- Matériels et méthodes**

**1a- Construction des transgènes**

Pour construire pCD4 représenté sur la figure 1A, le fragment Pst1 du promoteur humain CD4 (hCD4) décrit par P. Salmon et al, (1993), et comprenant les nucléotides -1076 à +20, a été ligaturé au fragment cDNA EcoR1-BamHI de 1,8 kb et codant pour la protéine CD4 humaine ; cette protéine a été caractérisée par Maddon P.J. et al dans Cell 42 : 93:104 (1985). La séquence de polyadénylation provient d'un fragment BamH1-Bgl2 de 0,8 kb du virus SV40.

Dans la construction du plasmide EpCD4 (figure 1B) on a ajouté à la construction pCD4 un fragment amplifié par PCR de l'amplificateur CD4 murin directement en amont du promoteur hCD4 de la construction précédente. Brièvement, l'ADN génomique murin a été soumis à une amplification par PCR en utilisant des amorces complémentaires des séquences limitrophes de la séquence minimale de 339 paires de bases de l'amplificateur déjà décrit plus haut et contenant des sites de restriction additionnels Sph1. Les produits PCR ont été clônés dans le plasmide pCD4, et les séquences des inserts

ont été vérifiées. Un clone contenant 3 copies de l'amplificateur murin a été retenu pour constituer les souris transgéniques.

#### 1b- Génération et criblage des souris transgéniques

Des fragments Hind3-EcoRI de DNA ont été générés à partir des plasmides pCD4 et EpDC4, et séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Les transgènes ont ensuite été élués en utilisant le système d'élution Biotrap (Schleicher et Schuell, Dassel, Germany) et ajustés à une concentration de 5 ng par µl dans 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, EDTA 0.1mM.

Les souris transgéniques porteuses des plasmides pCD4 et EpCD4 ont été obtenues et caractérisées comme décrits dans Hogan B et al (1986) dans Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory Manual ; Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. Les transgènes ont été microinjectés dans les pronucléi des zygotes en F2 obtenus d'un croisement de deux : [C57 Bl/6 DBA/2] F1. Les animaux transgéniques ont été détectés par hybridation du DNA préparé à partir de biopsies de queue, avec une sonde spécifique radiomarquée du CD4 humain qui est le fragment de 1,8 kb EcoRI-BamHI du CD4 humain et décrit dans l'article de Maddon P. et al. (1985).

#### 1c- Anticorps utilisés

Les anticorps monoclonaux directement marqués suivants ont été utilisés les sigles ayant les significations suivantes : FITC = isothiocyanate de fluorescéine, PE : phycoérythrine ; QR : quantum red ; SA : streptavidine; APC : allophycocyanine; PerCP : peridinine chlorophylle protéine; m : murin; h : humain.

Liste des anticorps :

anti-mCD4 (IgG2b de rat marquée PE ou APC, clone YTS 191.1),  
anti-mCD8 (IgG2b de rat marquée FITC ou PE, clone YTS 169.4),  
anti-mCD3 (IgG de hamster marquée FITC, clone 500-A2),  
anti-mB220 (IgG2a de rat marquée FITC, clone RA3-6B2),

anti-mTCR $\alpha\beta$  (IgG de hamster marquée FITC, clône H57-597) et  
anti-mMAC1, (IgG2b de rat marquée FITC, clône M1-70.15),  
provenant de Caltag Laboratories (San Francisco, CA);  
anti-mTCR $\gamma\delta$ , (IgG de hamster marquée PE, clône GL3),  
5 anti-mNK, (IgG2a de souris marquée PE, clônes PK 136 et 5E6),  
anti-mHSA, (IgG2b de rat marquée PE, clône M1/69)  
provenant de PharMingen (San Diego, CA);  
anti-hCD4 (IgG1 de souris marquée QR, clône Q4120)  
et un contrôle négatif (IgG1 de souris marquée QR, MPOC-21)  
10 provenant de Sigma Immunochemicals (St Louis, MO)

1d- Préparation des cellules et analyse en cytométrie de flux

Toutes les analyses ont été réalisées sur des souris de 8 à 20  
semaines. Le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques sont  
dilués dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)  
15 provenant de Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD), resuspendus  
à la pipette, centrifugés à 1100 TPM pendant 5 minutes, puis  
resuspendus dans un tampon de marquage composé de PBS  
contenant 2% de sérum de veau foetal et 0,02 % d'azide de sodium. La  
suspension de cellules spléniques a été mélangée à deux volumes de  
20 chlorure d'ammonium à 0,8% pour lyser les érythrocytes, puis  
centrifugée immédiatement et resuspendue dans le tampon de  
marquage. Après comptage, toutes les cellules en suspension sont  
ajustées à une concentration finale de 10 à 20 x10<sup>6</sup> cellules/ml. Pour  
les analyses des cellules B et des macrophages, une concentration  
25 finale de 2% de sérum autologue a été ajoutée au tampon de coloration  
avant l'addition des anticorps monoclonaux. Les marquages ont été  
réalisés en incubant 1 à 2x10<sup>6</sup> cellules avec les anticorps monoclonaux  
pendant 30 minutes à 4°C ; Après un lavage final, les cellules ont été  
fixées dans 0,5 à 1 ml de 1% de paraformaldehyde dans du PBS. 10 à  
30 40 000 cellules ont ainsi été analysées en cytométrie de flux  
(FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Des thymocytes SP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> purifiés ont été obtenus après double marquage coloration d'une suspension cellulaire thymique totale avec des anticorps anti-mCD4 marqués à l'APC et des anticorps mCD8 marqués PE, pendant 1 heure dans la glace, puis lavés et filtrés à travers un filtre cellulaire en nylon de type Falcon 2350 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Les cellules APC<sup>+</sup> et PE<sup>-</sup> sont triées avec un FACStarPlus (Becton Dickinson) dans du tampon PBS avec 0,02% d'azide de sodium.

Lorsque 10<sup>6</sup> cellules SP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> ont été obtenues par tri cellulaire, elles sont lavées et resuspendues dans 250 µl de tampon de marquage, et séparées en deux tubes et soumises à un marquage avec des anticorps anti-HSA marqués à la PE, et soit des anti-hCD4 marqués QR ou des anticorps isotypiques contrôles. Les cellules ont été analysées sur un FACScan et analysés comme décrit ci-dessus.

## 2- Résultats

### 2-1 Une expression détectable du gène reporter constitué du cDNA du CD4 in vivo nécessite la présence de l'amplificateur en sus du promoteur du CD4.

Le tableau 1 ci-dessous résume le pourcentage des cellules exprimant le gène reporter hCD4 au niveau du thymus, de la rate, des ganglions lymphatiques et des CMNSP (cellules mononuclées du sang périphérique), la présence du CD4 a été analysée par cytométrie de flux comme décrit ci-dessus. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'animaux testés ; et les résultats indiquent la moyenne obtenue entre les différents animaux testés plus ou moins l'écart type.

TABLEAU 1

Construction	Thymus	Rate	Ganglions Lymphatiques	CMNSP
pCD4 (7 lignées)	<1	<1	N.D.	<1
EpCD4	8±3.0 (10)	30±6.1 (10)	75±13.4 (6)	58±14.0 (6)

Sept lignées transgéniques ont été obtenues portant 1 à 40 copies du plasmide pCD4, ne comportant donc pas l'amplificateur ; aucune cellule hCD4 positive n'a pu être détectée dans ces conditions.

Pour la construction EpCD4, quatre lignées ont été obtenues avec 5 à 20 copies de la construction qui expriment toutes le transgène hCD4, deux ont été analysés en détail (lignée 7 et lignée 10). Les résultats du tableau pour EpCD4 ont été obtenus dans la lignée 10 et des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée 7.

Les cellules de la rate, des ganglions lymphatiques et des CMNSP sont des cellules matures obtenues après la sélection du répertoire ce qui explique le pourcentage nettement plus important des cellules exprimant le CD4 dans ces cellules que celui obtenu dans le thymus.

En conclusion, il apparaît que la présence de l'amplificateur du gène CD4 est nécessaire et suffisante pour obtenir l'expression du gène reporter.

## 2.2- Expression du transgène EpCD4 dans les organes lymphoïdes périphériques.

Les lignées transgéniques 10 et 7 de EpCD4 ont été analysées pour connaître les types cellulaires qui expriment le transgène. Ainsi, nous avons réalisé des analyses en cytométrie de flux après double ou triple marquages sur des splénocytes en utilisant des anticorps monoclonaux contre le CD4 humain en combinaison avec des anticorps monoclonaux reconnaissant différents types cellulaires hématopoïétiques.

Comme le montre la figure 2, l'expression de hCD4 est restreinte aux lymphocytes T et aux cellules NK. L'expression de hCD4 a été détectée dans toutes les cellules T au même niveau, que ces dernières expriment CD4 ou CD8. L'expression est comparable dans les cellules lymphocytes exprimant un récepteur  $\gamma\delta$ . Aucune expression n'a pu être détectée ni dans les monocytes ni dans les lymphocytes B des souris analysées (figure 2D-E).

La majorité des cellules NK, définies comme étant reconnues tant par les anticorps monoclonaux PK136 que 5E6, ont également été trouvées comme exprimant le hCD4 en proportion variable (figure 2F). L'ensemble de ces résultats indique que l'expression du transgène EpCD4 dans les cellules périphériques est restreinte aux cellules T et aux cellules NK.

Les résultats de cette figure ont été reproduits trois à douze fois lors d'expériences indépendantes. Lors de l'analyse des cellules NK, deux anticorps monoclonaux différents ont été utilisés (PK136 et 5E6) révélant une proportion de cellules hCD4+ allant de 74 à 100%. Ces fréquences sont toujours légèrement plus élevées dans les cellules 5E6+ que dans les cellules PK136+.

Les résultats obtenus pour les lymphocytes SP CD4+ et SP CD8+ ont été reproduits pour les ganglions lymphatiques et les cellules mononuclées du sang périphérique.

Ces résultats ont été obtenus dans la lignée 10, et des résultats comparables ont été obtenus dans la lignée 7.

### 25 3- Expression du transgène EpCD4 dans les thymocytes.

Dans la figure 3 qui représente l'analyse de l'expression du gène reporter hCD4, la fréquence moyenne de thymocytes hCD4+ trouvée dans les DN, DP, SP CD4 et SP CD8 sont (moyenne plus ou moins écart-type) : 21% plus ou moins 6,7%, inférieur à 1%, 62% plus ou moins 8,4% et 67% plus ou moins 18,1% pour la lignée 10 (n=13), et 30 13% plus ou moins 6,0%, inférieur à 1%, 41% plus ou moins 12,9% et



68% plus ou moins 13,0% pour la lignée 7 (n=7). Le hCD4 est indétectable dans les thymocytes DP alors qu'une fraction très significative des SP exprime le transgène.

L'expression du hCD4 a été détectée dans une fraction minoritaire des thymocytes DN (10 à 25% en moyenne). Bien que ces cellules DN et hCD4+ représentent moins de 1% des thymocytes totaux, il était important de vérifier leur phénotype pour savoir s'il s'agit de précurseurs thymiques précoces DN ou des cellules T matures DN (exprimant alors un TCR/CD3). Pour cela il a été réalisé un triple marquage avec :

- un mélange d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 marqués PE,
- un anticorps anti-hCD4 marqué QR,
- un anticorps soit anti-CD3, soit anti-TCR  $\alpha\beta$ , soit anti-TCR  $\gamma\delta$ , marqués FITC.

Comme le montre la figure 4, les thymocytes doubles négatifs et hCD4+ sont tous constitués de cellules exprimant un récepteur CD3/TCR ; parmi ces cellules 3/4 expriment le TCR  $\alpha\beta$  alors que 1/4 expriment le TCR  $\gamma\delta$ . Cela signifie donc que le transgène EpCD4 est exprimé non pas dans des thymocytes immatures DN mais dans des thymocytes matures DN qui expriment un récepteur pour l'antigène.

Au contraire le transgène EpCD4 a été trouvé être exprimé dans une fraction très importante des thymocytes SP quelque soit leur phénotype CD4+ ou CD8+ (figure 3).

Ces résultats sont très surprenants et ne pouvaient être prévus d'après les données disponibles à ce jour.

Il ressort de ce qui précède que le mini-gène CD4 est exprimé dans toutes les cellules T périphériques et seulement sur une fraction des thymocytes SP ; la question se pose donc de savoir si cette expression dans les SP est corrélée aux étapes de différenciation des thymocytes SP.

Pour répondre à cette question des thymocytes SP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> ont été analysés quant à l'expression de HSA et hCD4 à leur surface. Ceci est représenté dans la figure 5 et indique clairement que seuls les thymocytes les plus matures (HSA<sup>-</sup>) expriment hCD4 alors que leurs  
5 précurseurs HSA<sup>+</sup> ne l'expriment pas et qu'il existe donc une filiation hCD4<sup>-</sup> HSA<sup>+</sup> vers hCD4<sup>+</sup> HSA<sup>-</sup> dans les SP CD4<sup>+</sup>.

Ces résultats montrent que l'expression du transgène EpCD4 est directement liée à l'étape de maturation des cellules T quelle que soit la lignée CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> : elle apparaît sur les thymocytes SP les plus  
10 matures puis se maintient en périphérie.

Au total, cette combinaison de séquences régulatrices (promoteur+amplificateur) permet de contrôler l'expression d'un gène reporter dans les seules cellules T matures et une proportion variable de cellules NK. Il s'agit d'une observation qui n'était pas prévisible car  
15 les données disponibles jusqu'à ce jour suggéraient que la combinaison de ces éléments devait gouverner l'expression d'un gène reporter dès le stade DP. Ils impliquent l'existence d'un élément régulateur additionnel non encore identifié permettant d'obtenir l'expression dans les DP et qui pourrait être présent dans le premier  
20 intron du gène CD4.

**Exemple 2 : Expression d'un mini-gène HSV1-TK dans les cellules T matures de souris transgéniques :**

Un Plasmide EpTK a été construit ; il est composé des mêmes éléments régulateurs que EpCD4 précédemment décrit, soit 3 copies  
25 de l'activateur (enhancer) murin, le promoteur CD4 humain proT4 et le signal PolyA de SV40. Il diffère de EpCD4 en ce que le cDNA de hCD4 a été remplacé par un fragment de 1,3 kb contenant l'ADN codant pour HSV1-TK. Des souris transgéniques ont été réalisées pour détruire spécifiquement grâce à un traitement par le ganciclovir les lymphocytes  
30 T matures CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en division (activés). Cette destruction touche également les DN CD3<sup>+</sup>, les lymphocytes  $\gamma\delta$ . et une proportion

de cellules NK. En revanche, cette destruction ne touche pas les précurseurs thymocytaires immatures DP qui représentent la principale population thymique. Les lymphocytes T provenant de ganglions lymphatiques des souris transgéniques soient détruits in vitro par le ganciclovir, lorsqu'ils sont cultivés en présence d'un mitogène comme la concanavaline A.

Dans ces souris transgéniques, utilisées pour étudier l'homéostasie et le taux de renouvellement des lymphocytes T, une disparition progressive d'une proportion de lymphocytes T matures au cours du temps sous traitement par le ganciclovir est observée.

Quand ces souris transgéniques subissent une délétion provoquée des lymphocytes répondeurs à un antigène donné, une tolérance spécifique d'antigène lorsque le ganciclovir est administré dans la période entourant l'immunisation par l'antigène est obtenue.

Dans ces souris transgéniques, on observe un contrôle d'une réaction du greffon contre l'hôte lors du traitement par le ganciclovir, quand cette réaction a été créée par greffe de moelle osseuse mélangée à des lymphocytes T matures provenant de souris EpTK. Un autre résultat en est le traitement ou la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte avec maintien de la réaction du greffon contre la leucémie (GVL, graft versus leukemia).

Dans des souris transgéniques réalisées avec des constructions de type EpTK modifiées en ajoutant divers éléments régulateurs précédemment cités provenant du gène CD4 humain ou d'autres espèces, et en particulier le silenceur du gène CD4 dans les lymphocytes CD8 et diverses séquences provenant du premier intron du gène CD4, des populations T où s'exprime HSV1-TK lorsque celles-ci sont en division, sont détruites par le ganciclovir.

Différentes constructions contenant HSV1-TK et placées sous le contrôle des séquences régulatrices précédemment décrites provenant du gène CD4 de différentes espèces animales peuvent être réalisées

dans le but de fabriquer des vecteurs d'expression. Ces vecteurs sont d'une part des vecteurs non viraux, et d'autre part des vecteurs viraux, notamment rétroviraux ou dérivés d'AAV ou d'adénovirus. Tous ces différents vecteurs peuvent être utilisés pour transduire le gène HSV1-TK sous contrôle des différentes séquences régulatrices précédemment décrites dans, soit les lymphocytes T périphériques cultivés ex vivo, soit les cellules de moelle osseuse et notamment les cellules souches hématopoïétiques. Un résultat attendu est la reproduction de la spécificité d'expression obtenue avec les souris transgéniques exprimant HSV1-TK sous contrôle des mêmes séquences régulatrices que celles du vecteur, soit après sa transduction dans les lymphocytes T périphériques ex vivo, soit après sa transduction dans les cellules souches hématopoïétiques.

**Exemple 3 : Construction génétique permettant une expression spécifique dans les lymphocytes T CD4+ matures :**

L'addition à la construction, contenant le promoteur et l'enhancer de CD4, d'une séquence dite « silencer de CD4 » déjà identifiée, permet la réalisation d'une construction génétique dont l'expression est maintenant restreinte exclusivement aux lymphocytes TCD4+ matures chez les souris transgéniques (figure 7). Les thymocytes doubles négatifs, les thymocytes doubles positifs, et les lymphocytes TCD8+ matures, n'expriment pas le transgène. En conséquence, ce type de construction peut être utilisé pour véhiculer un transgène de façon exclusive dans les T CD4+ matures, par exemple dans une perspective de thérapie génique, lorsque ces séquences régulatrices sont incluses dans un vecteur rétroviral.

**- délétion de clones T spécifiques :**

Les séquences régulatrices promoteurs de CD4 et enhancer de CD4 préalablement utilisées chez la souris transgénique pour une expression exclusivement dans les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ matures, ont été utilisées pour l'expression d'un gène suicide

HSV1 TK. Des souris transgéniques ont été réalisées avec cette construction génétique.

La fonctionnalité de la construction génétique est démontrée par culture de lymphocytes matures des ganglions de ces souris transgéniques en présence de ganciclovir, après activation *in vitro* par un mitogène. Les concentrations de ganciclovir toxiques pour les cellules de souris transgéniques sont cent fois plus faibles que celles nécessaires pour tuer des lymphocytes T de souris non transgéniques (figure 8a).

Cette fonctionnalité ayant été démontrée, la démonstration de l'utilité de l'expression d'un gène HSV1 TK sous le contrôle de ces séquences régulatrices pour des applications thérapeutiques, peut être analysée. L'idée générale est de détruire les cellules lorsqu'elles sont activées par l'antigène dans des situations où des lymphocytes T sont responsables de pathologies. La démonstration de la faisabilité de ce procédé peut être réalisée en injectant chez les souris transgéniques et les souris contrôles un super antigène connu pour activer spécifiquement les lymphocytes porteurs d'un V $\beta$ 7. Dans les souris contrôles, que ce soit dans les populations CD4+ ou CD8+, l'activation par le super antigène SEB aboutit à un doublement du pourcentage des cellules V $\beta$ 7. Au contraire, en présence du traitement par le ganciclovir, il n'y a pas de modification du nombre de ces cellules (figure 8b). Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une destruction spécifique de cellules activées par un antigène lorsque les lymphocytes T expriment le gène HSV1 TK sous contrôle de ces séquences régulatrices.

- traitement de la réaction du greffon contre l'hôte :

La fonctionnalité de ce système pour le contrôle d'une réaction du greffon contre l'hôte a été testée. Des souris irradiées sont reconstituées avec des cellules de moelle osseuse et des splénocytes provenant de souris transgéniques exprimant le gène HSV1-TK sous le

contrôle du promoteur de CD4 et des enhancers de CD4. Cette greffe de moelle est réalisée dans un contexte allogénique, et dans cette situation, les splénocytes réinjectés en même temps que la moelle osseuse sont responsables d'une réaction du greffon contre l'hôte mortel.

Dans ces expériences, on observe 100 % de mortalité chez les animaux ayant reçu une telle greffe de moelle en condition allogénique. Au contraire, le traitement par le ganciclovir pendant les sept jours qui suivent la greffe de moelle est suffisant pour empêcher totalement le développement d'une réaction du greffon contre l'hôte. Dans ces conditions, la plupart des animaux survivent à la greffe de moelle, sans signe de GVH (figure 9).

Le tableau ci-dessous montre le pourcentage de survie avec les souris transgéniques TK à partir des résultats de 3 expériences allant de J 120 à J 41 effectuées sur des souris irradiées :

TABLEAU 2 :

GROUPES	GMO+	CONTROLES	TRAITES
	84 % (n = 13)	0 % (n = 23)	93 % (n = 14)

Le tableau ci-dessus fait apparaître que les souris irradiées recevant une greffe de moelle osseuse (GMO+) survivent, tandis que les mêmes souris recevant de la moelle osseuse et des splénocytes meurent de GVH (contrôle) sauf lorsque les splénocytes proviennent de souris transgéniques et que les souris sont traitées par le ganciclovir (traitées).

La démonstration que ce phénomène est bien due à une destruction des clones de lymphocytes T impliqués dans la GVH, peut être

apportée par l'étude de la fonctionnalité des lymphocytes de ces souris. En effet, lorsque l'on prélève ces lymphocytes et qu'on les active dans des réactions mixtes lymphocytaires utilisant comme cellules stimulantes, soit des lymphocytes de même origine que le receveur, soit des lymphocytes d'une tierce origine, on constate qu'il n'y a aucune activation contre les cellules du receveur, tandis qu'il y a une activation normale contre les tierces cellules. Ces résultats démontrent qu'on a abouti, chez les souris ayant survécu à la greffe de moelle, à une délétion des clones spécifiquement capables de reconnaître les allo-antigènes du receveur, et impliqués dans la GVH.

**Exemple 4 : Constructions contenant différentes séquences du promoteur CD4 humain :**

Différentes constructions génétiques ont été réalisées afin de rechercher quelles sont les séquences régulatrices minimales dérivées des séquences du gène CD4 qui permettent l'expression d'un transgène spécifiquement dans les lymphocytes T. Toutes ces constructions sont utilisées pour contrôler l'expression d'un gène rapporteur P. La construction de base contient les 1100 paires de base du promoteur du gène CD4 et l'enhancer de CD4 présent en 3 exemplaires. A partir de cette construction, différentes autres constructions génétiques ont été réalisées selon le schéma de la figure 10.

Les résultats de l'analyse de l'expression du gène rapporteur après transfection de ces différentes constructions génétiques de la lignée 4 dans les cellules Jurkat montrent (figure 11) que :

1) de façon générale l'expression est 10 fois plus élevée en présence de l'enhancer du CD4 qu'en son absence ;

2) le fragment -169+ 16 de la construction P $\beta$ 1-2C est aussi efficace que l'ensemble du fragment de 1100 paires de base pour diriger l'expression du gène rapporteur.

En conclusion, ces résultats montrent que les séquences régulatrices courtes dérivées du promoteur et enhancer du gène CD4 et de taille compatible avec leur utilisation au sein de vecteurs viraux tels les vecteurs rétroviraux sont utilisables pour obtenir une  
5 expression spécifique dans les lymphocytes T.

Les mêmes constructions dérivées des séquences régulatrices de CD4 ne s'expriment pas dans des cellules non lymphoïdes CD4+ comme, par exemple, les cellules HELA.

Ces expériences montrent également que la présence  
10 d'une seule copie de l'enhancer CD4 est suffisante pour obtenir l'expression attendue.

Ci-après se trouvent les légendes complémentaires des figures 9 et 10.

15 Figure 9 : le groupe GMO- est représenté par la courbe A. Le groupe GMO+ est représenté par la courbe B. Le groupe GVH/GCV NTG est représenté par la courbe C. Le groupe GVH/PBS est représenté par la courbe D et le groupe GVH/GCV est représenté par la courbe E.

20 Figure 10 : Le site d'initiation de la transcription du gène CD4 humain est représenté par une flèche noire. Le gène de la phosphatase alcaline sécrétée humaine (rapporteur) est, quant à lui, matérialisé par le sigle pSEAP. Les rectangles noirs et grisés représentent les séquences homologues avec la souris respectivement  
25 2 « boîtes » conservées et 3 « boîtes » conservées. Enfin, « MEH3X » correspond au enhancer du gène CD4 murin qui, dans le présent test, est répété trois fois.



## REVENDICATIONS

1. Système d'expression d'une protéine ou d'un gène hétérologue comprenant un vecteur recombinant, utilisable pour la transduction de cellules de la lignée hématopoïétique, notamment les cellules souches, de sorte que ladite cellule ainsi transduite n'exprimera la protéine ou le gène hétérologue que dans les cellules T matures après la sélection du répertoire, ledit vecteur étant pourvu de toutes les séquences nécessaires à son expression, et caractérisé en ce qu'il contient au moins un amplificateur d'un gène CD4 de même espèce ou d'espèce différente.

2. Système d'expression selon la revendication 1 caractérisé en ce que le vecteur comprend également un promoteur constitué de l'une des séquences suivantes :

- le promoteur du gène CD4 humain tel que représenté dans la figure 6, ou
- la séquence comprise entre les nucléotides -498 à +16 de la figure 6, ou
- la séquence comprise entre les nucléotides -165 à +16 de la figure 6
- toute séquence dérivée de l'une des séquences précédentes par addition, délétion ou substitution de nucléotides sans modification substantielle de l'expression de la protéine hétérologue.

3. Système d'expression selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence amplificatrice est l'amplificateur du CD4 murin et comprend tout ou partie de la séquence suivante sous forme d'une à plusieurs copies :

TGTTGGGGTT	CAAATTTGAG	CCCCAGCTGT	TAGCCCTCTG
CAAAGAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAGAACAAA	GGGCCTAGAT
TTCCCTTCTG	AGCCCCACCC	TAAGATGAAG	CCTCTTCTTT
CAAGGGAGTG	GGGTTGGGGT	GGAGGCGGAT	CCTGTCAGCT
TTGCTCTCTC	TGTGGCTGGC	AGTTTCTCCA	AAGGGTAACA

GGTGTCTAGCT GGCTGAGCCT AGGCTGAACC CTGAGACATG  
CTACCTCTGT CTTCTCATGG CTGGAGGCAG CCTTTGTAAG  
TCACAGAAAG TAGCTGAGGG GCTCTGGAAA AAAGACAGCC  
AGGGTGGAGG TAGATTGGT

5 4. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le vecteur contient en outre, sous la dépendance du promoteur CD4 ou l'un de ses dérivés, tout ou partie du cDNA du gène CD4 humain.

10 5. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le vecteur contient en outre un silenseur de l'expression du gène CD8.

15 6. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la protéine hétérologue susceptible d'être exprimée dans les lymphocytes T matures, présente une toxicité conditionnelle pour le lymphocyte T mature.

20 7. Système d'expression selon la revendication 6 caractérisé en ce que la protéine hétérologue est la thymidine kinase de HSV1-TK ou une protéine dérivée de celle-ci, susceptible d'entraîner la mort du lymphocyte T activé en présence d'un analogue de nucléotide tel l'aciclovir ou le ganciclovir.

8. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que le vecteur est soit :

- un vecteur rétroviral, et l'amplificateur et le cas échéant le promoteur issu du promoteur CD4 humain étant insérés entre les deux séquences LTR du vecteur rétroviral,
- un vecteur adénoviral, ou un vecteur AAV, ou
- un système non biologique de délivrance d'acides nucléiques.

30 9. Cellule de la lignée hématopoïétique transfectée par un vecteur d'expression constitué au moins d'une séquence codant pour une protéine hétérologue, d'un promoteur et d'une séquence de polyadénylation, caractérisée en ce que ledit vecteur contient au moins

une séquence amplificatrice d'un gène CD4 de mammifère de même espèce ou d'espèce différente, la protéine hétérologue étant exprimée principalement dans les lymphocytes T matures issus de la sélection du répertoire.

5 10. Cellule transfectée selon la revendication 9 caractérisée en ce que le vecteur contient un promoteur constitué de l'une des séquences suivantes :

- le promoteur du gène CD4 humain tel que représenté dans la figure 6, ou

10 - la séquence comprise entre les nucléotides -498 +16 dans la numérotation de la figure 6, ou

- la séquence comprise entre les nucléotides -165 +16 dans la numérotation de la figure 6, ou

15 - toute séquence dérivée de l'une des séquences précédentes par addition, délétion ou substitution de nucléotides sans modification substantielle de l'expression de la protéine hétérologue.

11. Cellule transfectée selon l'une des revendications 9 à 10 caractérisée en ce que la protéine hétérologue présente une toxicité conditionnelle pour les cellules T matures.

20 12. Cellule transfectée selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisée en ce la protéine hétérologue est la thymidine kinase de HSV1-TK ou une protéine dérivée de celle-ci, susceptible d'entraîner la mort du lymphocyte T activé en présence d'un analogue de nucléotide tel l'aciclovir ou le ganciclovir.

25 13. Utilisation dans la fabrication d'un médicament utilisable en thérapie génique pour détruire spécifiquement les lymphocytes T activés d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 8.

30 14. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que le médicament permet de prévenir le rejet de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte.

15. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que le médicament permet de prévenir ou traiter des infections virales et notamment par le VIH.

5 16. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que le médicament permet de prévenir ou traiter les maladies auto-immunes.

17. Utilisation selon la revendication 13 caractérisée en ce que le médicament permet de prévenir ou traiter les déficits immunitaires primitifs ou secondaires.

10 18. Composition thérapeutique destinée à prévenir le rejet de greffe caractérisée en ce qu'elle contient un système d'expression d'un transgène selon l'une des revendications 1 à 8.

15 19. Composition thérapeutique destinée à prévenir ou traiter des infections virales, notamment par le VIH, caractérisée en ce qu'elle contient un système d'expression d'un transgène selon l'une des revendications 1 à 8.

20 20. Composition thérapeutique destinée à prévenir ou traiter les maladies auto-immunes caractérisée en ce qu'elle contient un système d'expression d'un transgène selon l'une des revendications 1 à 8.

21. Composition thérapeutique destinée à prévenir ou traiter la réaction du greffon contre l'hôte caractérisée en ce qu'elle contient un système d'expression d'un transgène selon l'une des revendications 1 à 8.

1/11

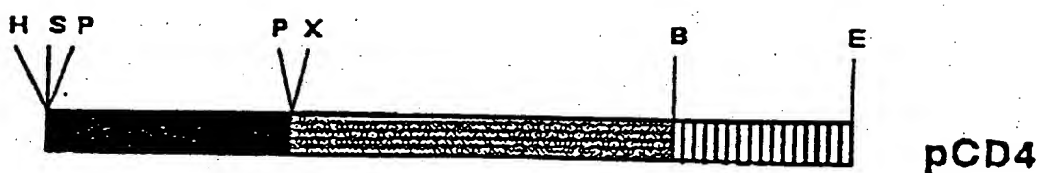


Fig. 1a

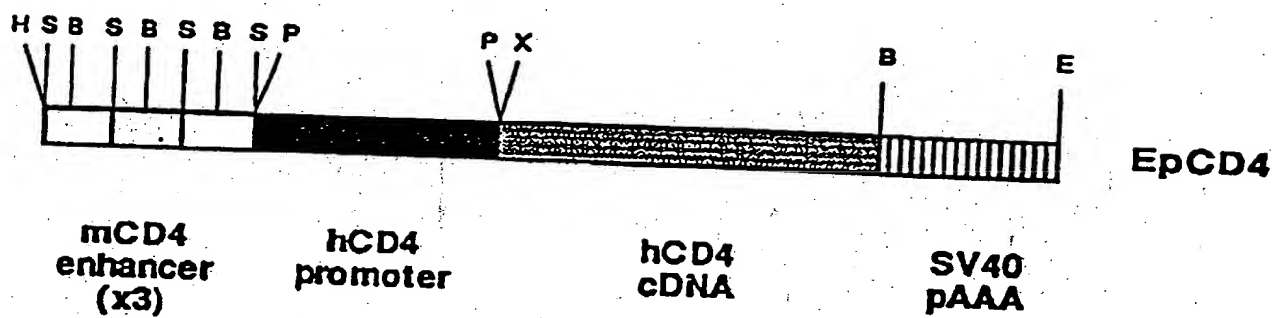


Fig. 1b

2/11

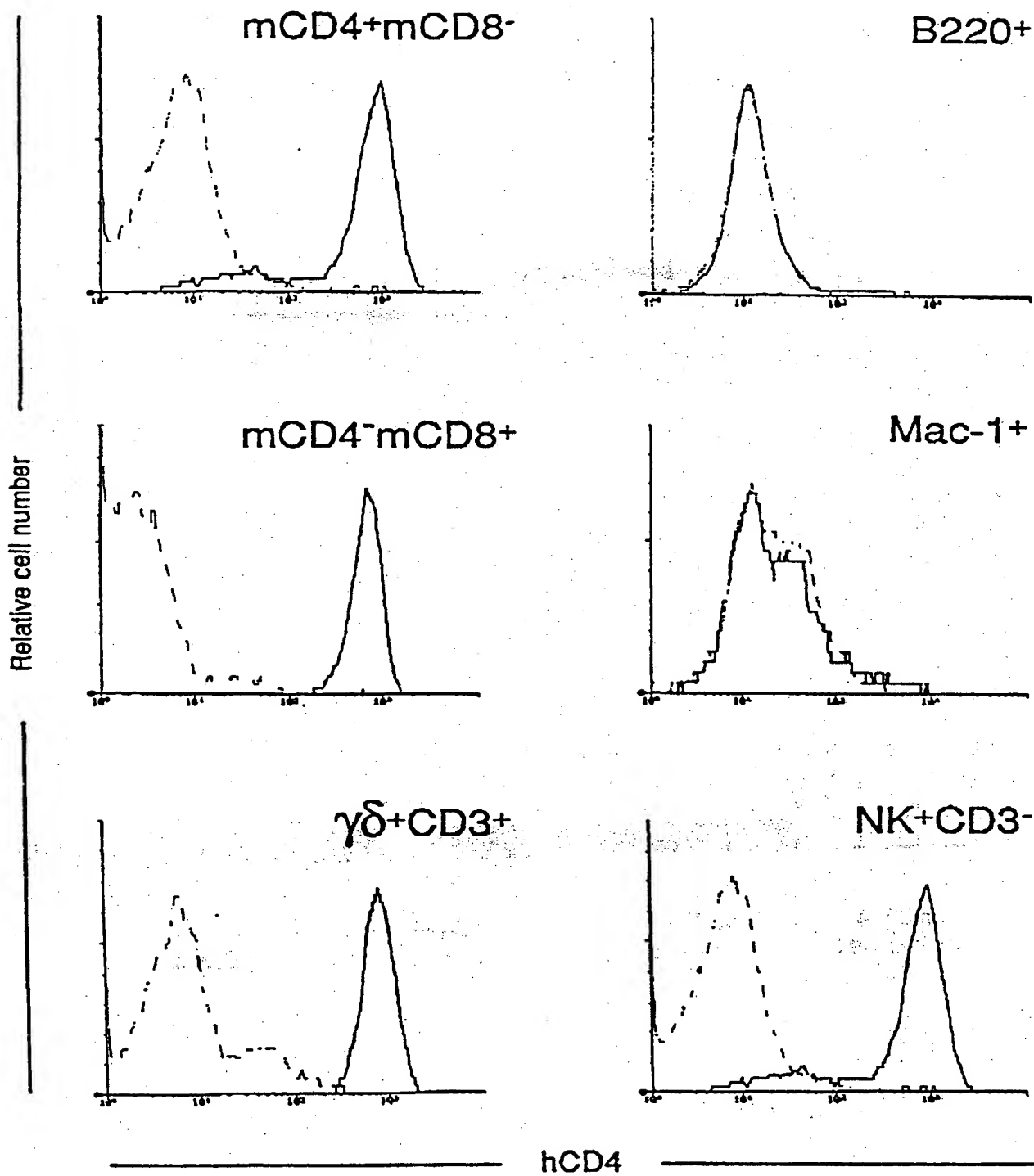


Fig. 2

3/11

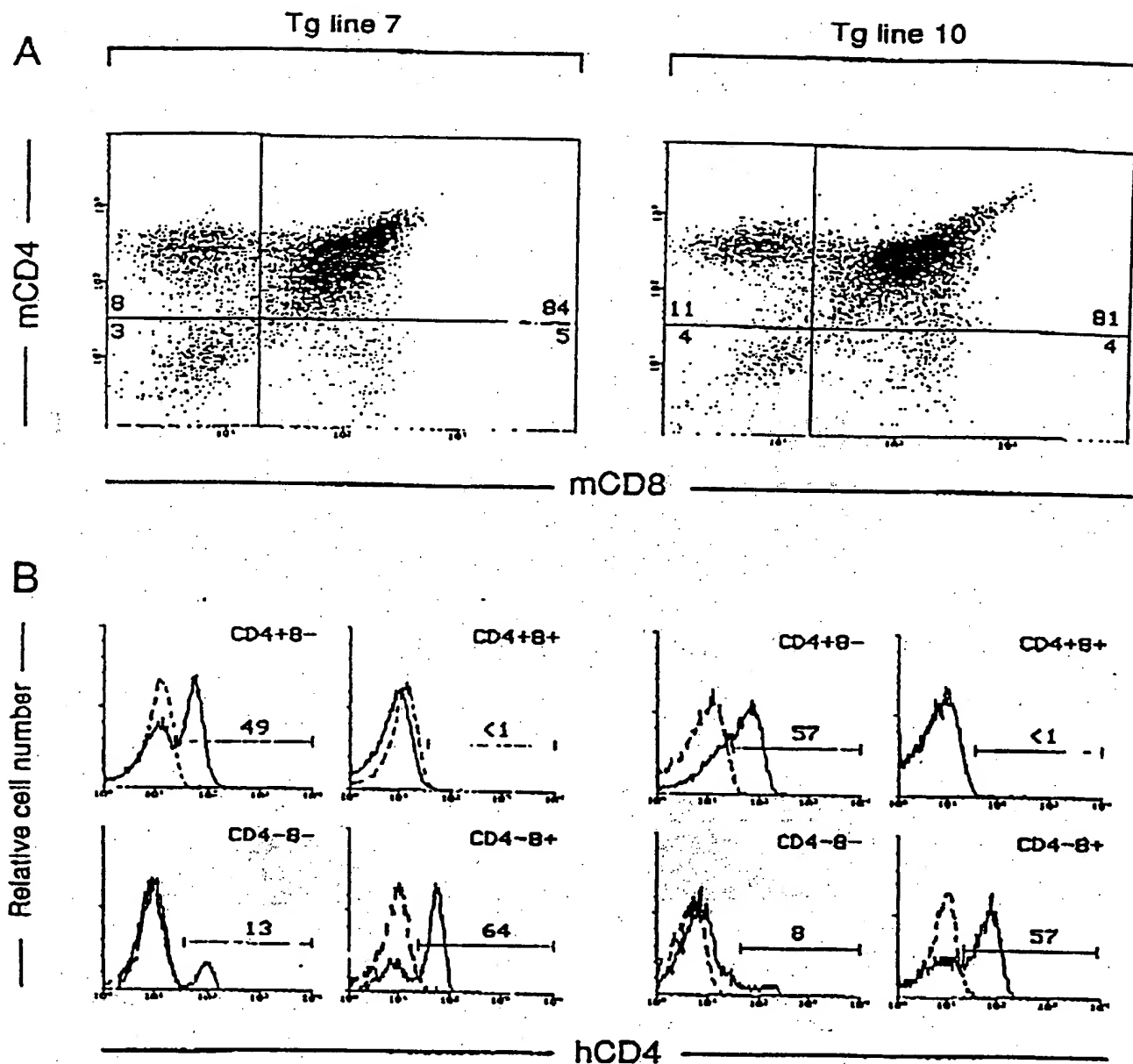


Fig. 3

4/11

## A DN thymocytes

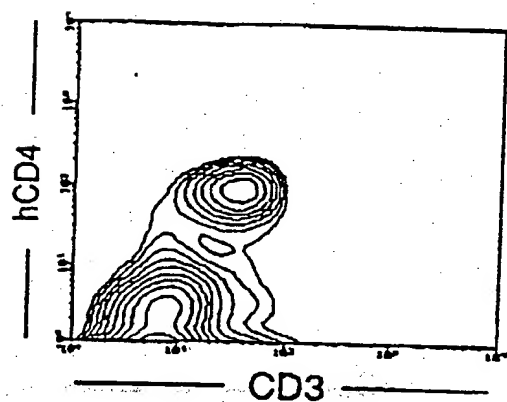
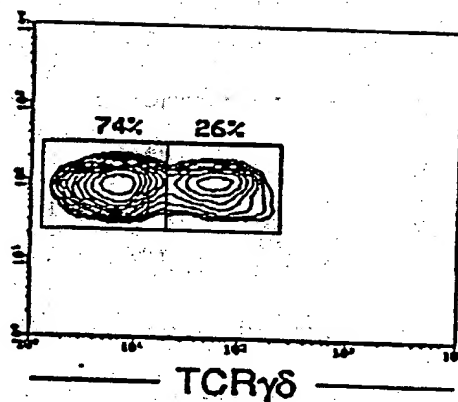
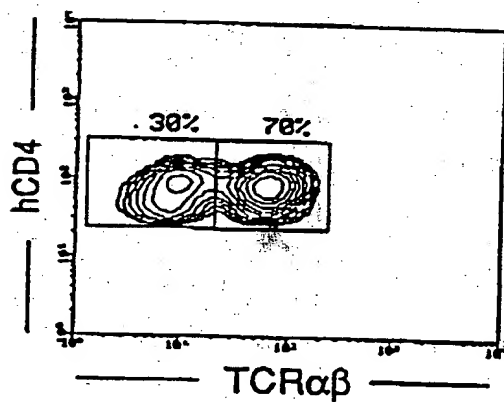
B DN hCD4<sup>+</sup> thymocytes

Fig. 4



5/11

mCD4+mCD8- sorted thymocytes

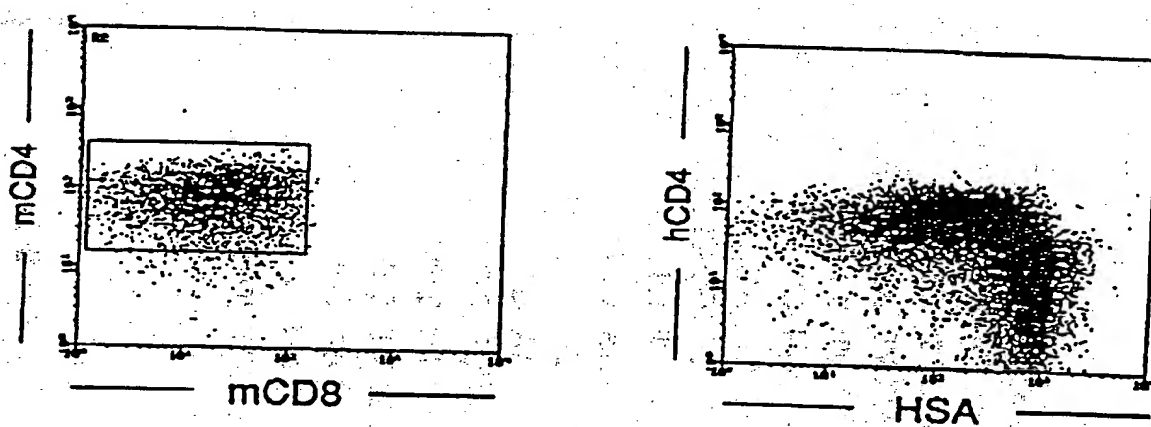


Fig. 5

6/11

CTGCAGCCTC AACTTCCTGG GCTCAAGCAA TCCTCCACC TCGGCCTCCT AAAATACTGG  
 CATATAGGC ATGAGCCACC ACTCCAGCA CCACCTTTT CAGACTGGAA AAGAACACTC  
 ACATGTGCAT CTTTAAATGA CACTGGGCT GTGGTATGA GAATGGCCAC CAGTGAGTAG  
 CAGGAGCTG TTGTCCGAGC AAGGCTGAT ATTGGCATCT TGGATTGGCA TGGTGGCAGT  
 AGTGGTAGTG CAGAGTGACT TGGTAGATT TTGGAGCATT TAGAAGGTAC ATCCACAGGA  
 ACTGGTAAAT AAATACGTGG GAGAAATTGG GTGAAGGGG TGTCAAAGAT TACACCCAAT  
 TTATTTTGCT TGGGAAGTTG GTGGATGGTG AGCCCTCAC TGAGTGAGAA GCCTGGAGAA  
 CAGGTTTGG AGGTGGTAG TATGCAGGTG GTATGCATAG TTGGGATGTG TGTTGAGTTT  
 CTATATGTCG GTGAGCTTCC CAGTGGAGAT GTCCAATGG CAGACGGATA CTCACATAGA  
 GAGTTCATGG TAGATTCGGG CTAGAGGAAA GCACCTGAGG CCTGGCCAGA GACGCCCTAG  
 GGAACAGAGC CTGGTTAACA GTCACTCCTG GTGTCTCAGA TATTCTCTGC TCAGCCCACG  
 CCTCTCTTC CACACTGGGC CACCTATAAA GCCTCCACAG ATACCCCTGG GGCACCCACT  
 GACACAAAT GCCCTCAGGG CCCACAGCA AGGAGCTGTT TGTGGGCTTA CCACTGCTGT  
 TC CATATGC CCCCAACTGC CTCCCACTTC TTTCCTCCACA GCCTGGTTCAG ACATGGCACT  
 ACCACTAATG GAATCTTTCT TGCCATCTTT TTCTTTGCCGT TTAAACAGTGG CAGTGACACT  
 TGAATCCTGA TTAAGCCTGA TTCTGCTTAA CTTTTTCCCT TGACTTTGGC ATTTTCACCT  
 TGACATGTC CCTGAGAGCC TGGGGGTGG GGAACCACT CCAGCTGGTG ACGTTTGGGG  
 CCGGCCCAGG CCTAGGCTGT GGAGGAGCCT TGCCATCGGG CTTCCCTGTCT CTCTTCATTT  
 ATCAGCACT CTGCAG

Fig. 6

7/11

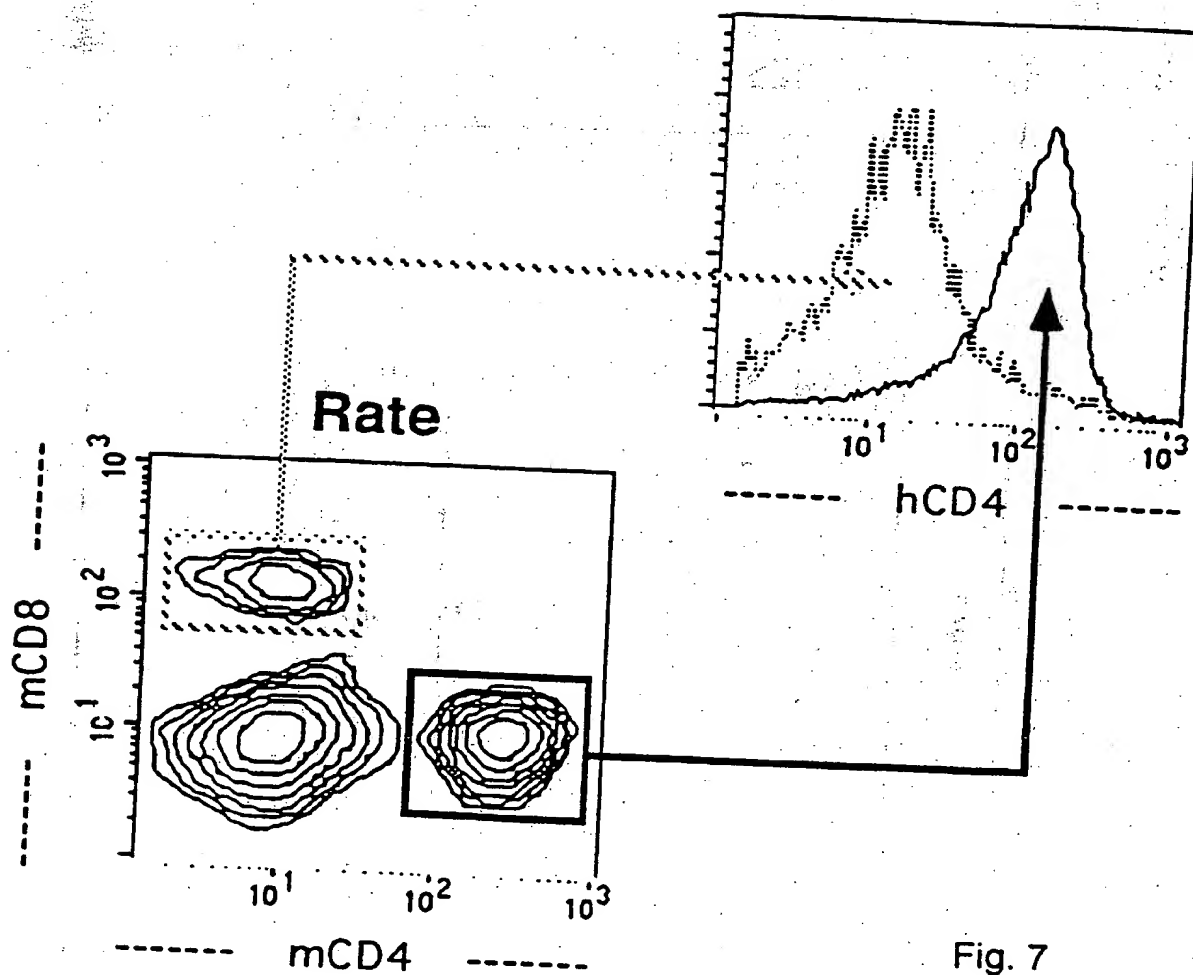
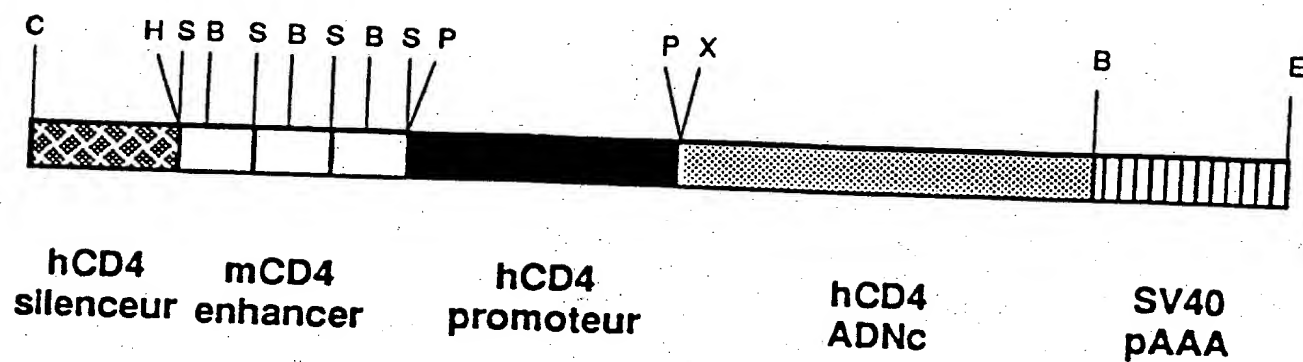
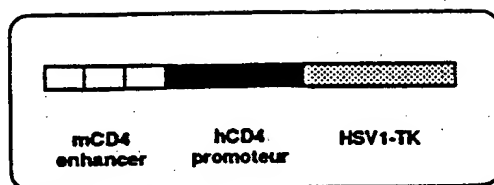
**Sil-EpCD4**

Fig. 7



**A**

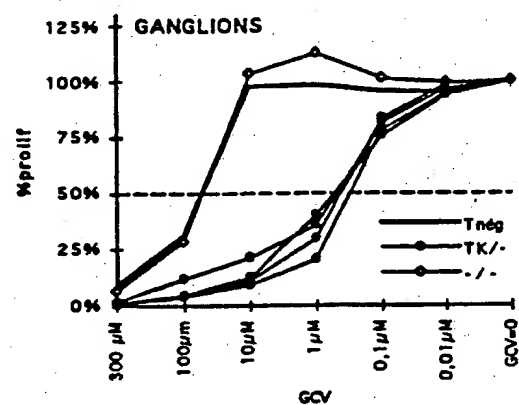


Fig. 8a

**B**

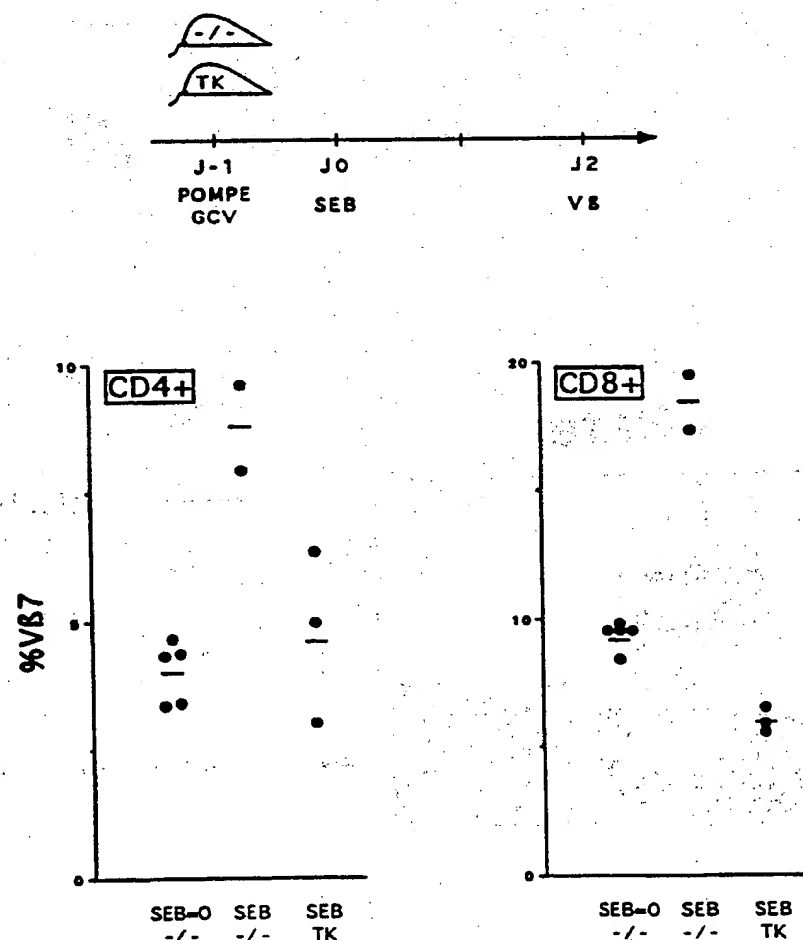


Fig. 8b

9/11

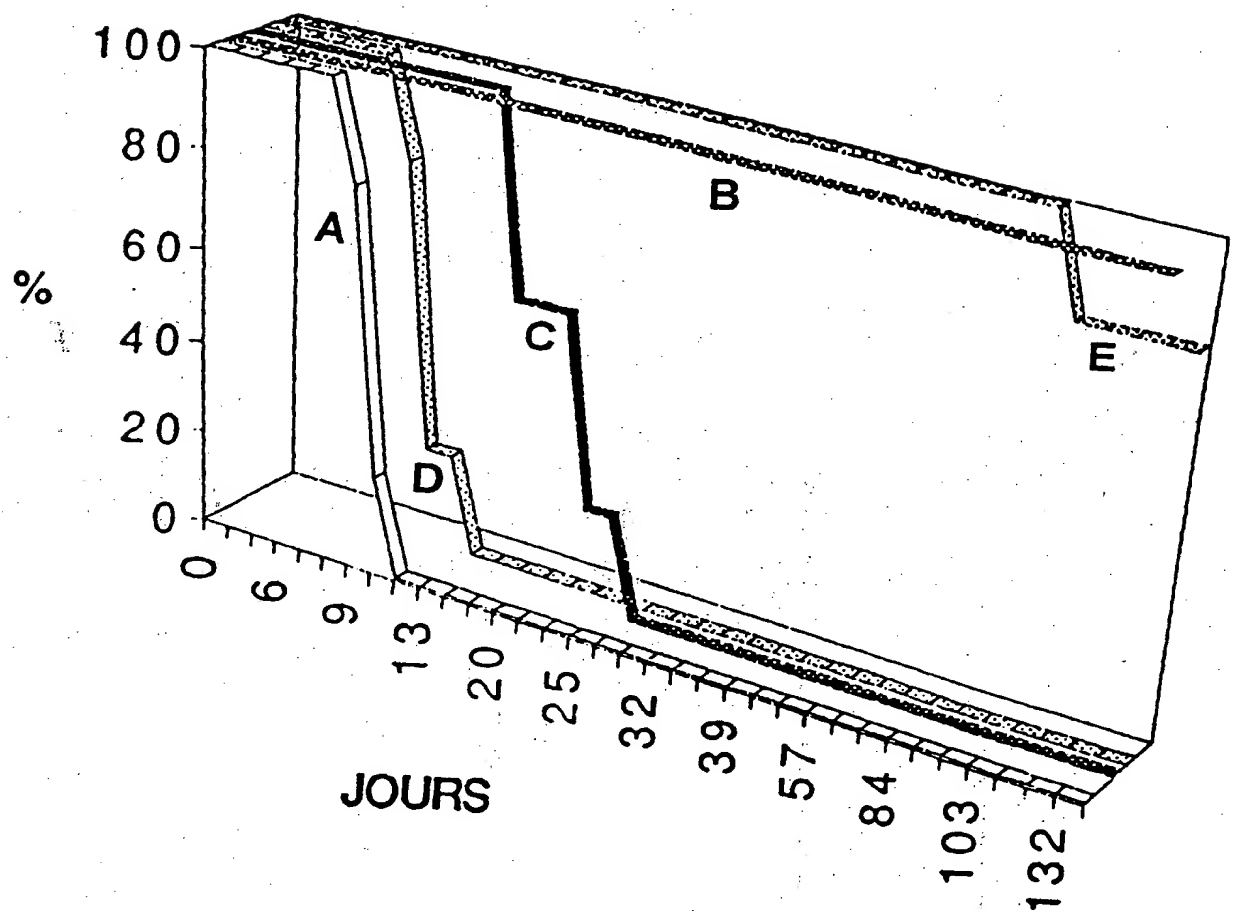


Fig. 9

10/11

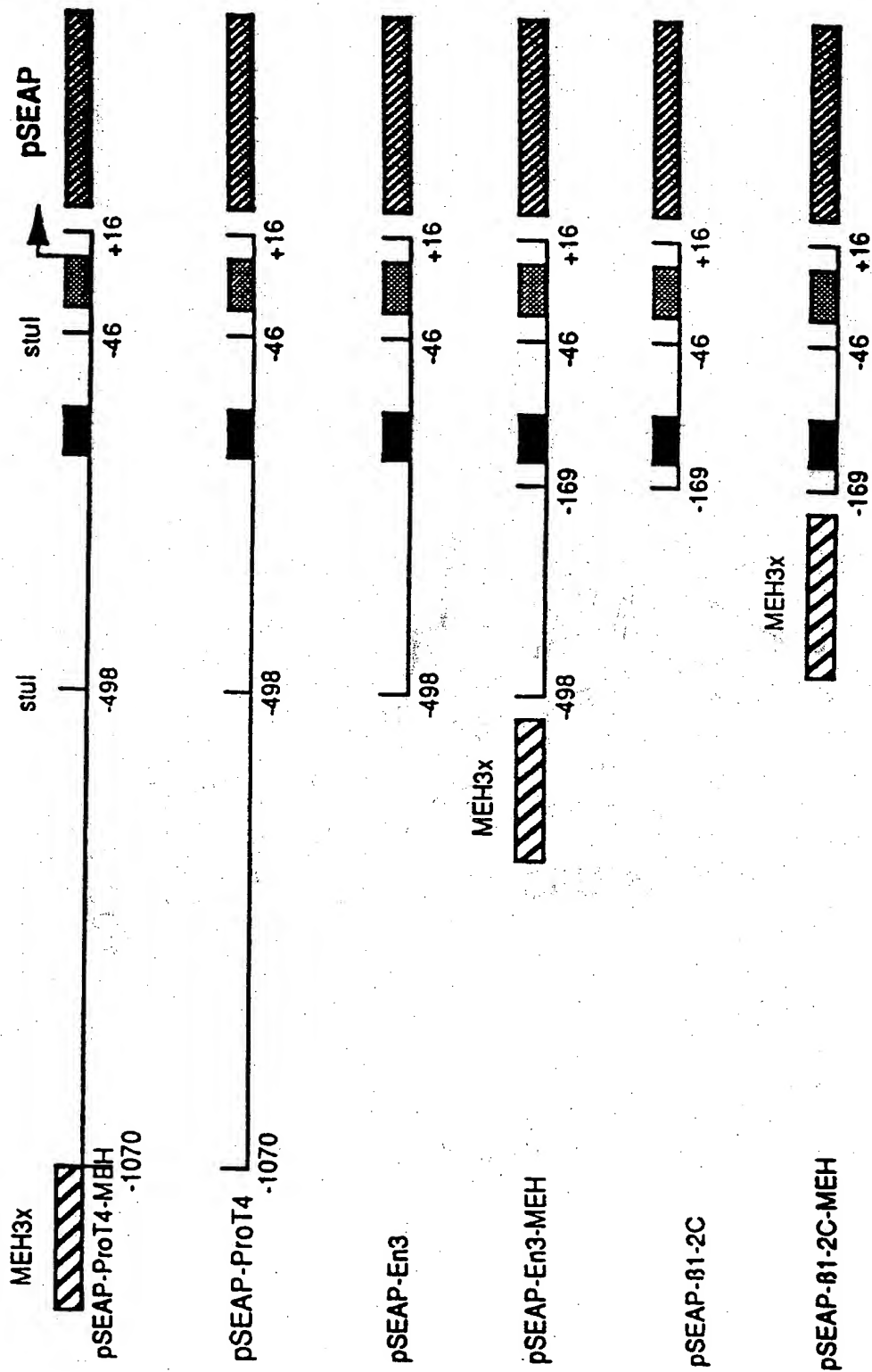


Fig. 10

11/11

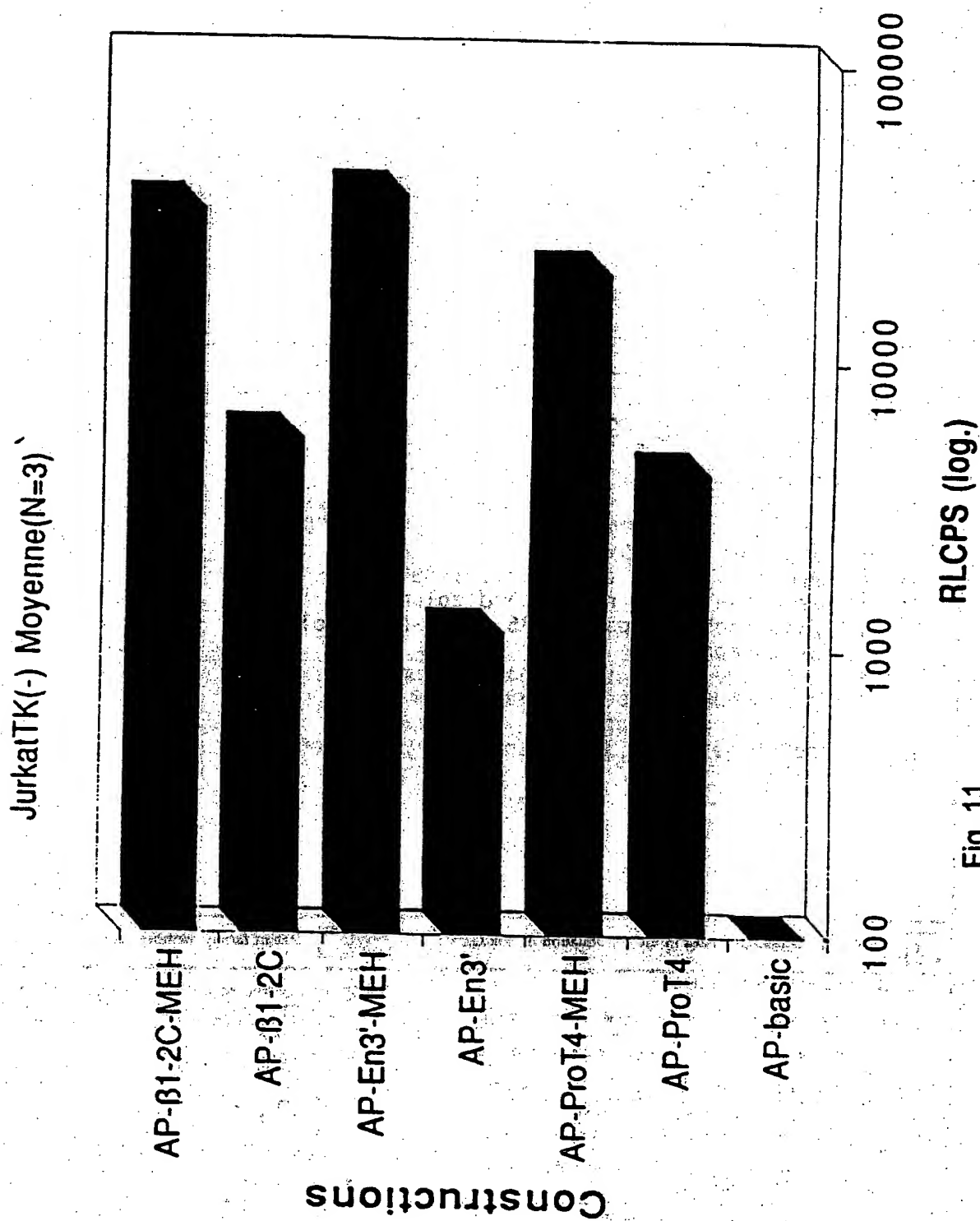


Fig. 11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 96/01122A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No. *
X	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 14, no. 2, February 1994, pages 1084-1094, XP002001074 ZAHER HANNA ET AL.: "Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+CD8- and immature CD4+CD8- T cells and in macrophages of transgenic mice" see page 1084, right-hand column, paragraph 3 - page 1085, left-hand column, paragraph 2 see page 1086, right-hand column, paragraph 2 - page 1089, right-hand column, paragraph 2 see page 1093, left-hand column, paragraph 3 --- -/--	1,2,4,5, 9,10,13, 15,19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 October 1996

Date of mailing of the international search report

05. 11. 96

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01122

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBO JOURNAL, vol. 12, no. 4, 1993, EYNSHAM, OXFORD GB, pages 1547-1553, XP002001075 NIGEL KILLEEN ET AL.: "Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4" cited in the application	1,4,5,9, 13, 15-17, 19,20
Y	see abstract see page 1547, right-hand column, paragraph 3 see page 1550, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 see page 1551, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column, paragraph 1 see page 1551, right-hand column, paragraph 3 - page 1552, left-hand column, paragraph 2	2,3,10
Y	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, no. 16, 15 August 1993, WASHINGTON US, pages 7739-7743, XP002001076 PATRICK SALMON ET AL.: "Characterization of the human CD4 gene core promoter is tissue-specific and is activated by Ets proteins " cited in the application see abstract; figure 1	2,10
Y	--- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 11, no. 11, 1 November 1991, pages 5506-5515, XP000567480 SHINICHIRO SAWADA ET AL.: "Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene" cited in the application see abstract see page 5506, right-hand column, paragraph 2 see page 5507, left-hand column, paragraph 3 see page 5508, left-hand column, last paragraph - page 5509, left-hand column, paragraph 1; figure 3 see page 5512, right-hand column, paragraph 3 - page 5513, left-hand column, paragraph 1	3

---

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01122

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 8, no. 5, 18 March 1994, BETHESDA, MD US, page A785 XP002001077 MCCREADY P.M. ET AL.: "Transient transfection of T cell lines with the murine CD4 promoter and the T cell-specific enhancer" * resumé n. 4554 *	1,9
P,X	--- THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 5, 1 March 1996, pages 1873-1879, XP002016452 PATRICK SALMON ET AL.: "characterization of a intronless CD4 minigene expressed in mature CD4 and CD8 T cells, but not expressed in immature thymocytes" see page 1874, left-hand column, paragraph 2 see page 1874, right-hand column, last paragraph - page 1875, left-hand column, paragraph 2 see page 1875, right-hand column, paragraph 3 - page 1876, left-hand column, paragraph 1 -----	1,4,8,9

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No  
PCT/FR 96/01122A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/86 C12N5/10

A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 14, no. 2, Février 1994, pages 1084-1094, XP002001074 ZAHER HANNA ET AL.: "Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+CD8- and immature CD4+CD8- T cells and in macrophages of transgenic mice" voir page 1084, colonne de droite, alinéa 3 - page 1085, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 1086, colonne de droite, alinéa 2 - page 1089, colonne de droite, alinéa 2 voir page 1093, colonne de gauche, alinéa 3</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	<p>1,2,4,5, 9,10,13, 15,19</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Octobre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EMBO JOURNAL, vol. 12, no. 4, 1993, EYNHAM, OXFORD GB, pages 1547-1553, XP002001075 NIGEL KILLEEN ET AL.: "Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4" cité dans la demande	1,4,5,9, 13, 15-17, 19,20
Y	voir abrégé voir page 1547, colonne de droite, alinéa 3 voir page 1550, colonne de gauche, alinéa 2 - alinéa 4 voir page 1551, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 1 voir page 1551, colonne de droite, alinéa 3 - page 1552, colonne de gauche, alinéa 2 ---	2,3,10
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, no. 16, 15 Août 1993, WASHINGTON US, pages 7739-7743, XP002001076 PATRICK SALMON ET AL.: "Characterization of the human CD4 gene core promoter is tissue-specific and is activated by Ets proteins " cité dans la demande voir abrégé; figure 1 ---	2,10
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 11, no. 11, 1 Novembre 1991, pages 5506-5515, XP000567480 SHINICHIRO SAWADA ET AL.: "Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene" cité dans la demande voir abrégé voir page 5506, colonne de droite, alinéa 2 voir page 5507, colonne de gauche, alinéa 3 voir page 5508, colonne de gauche, dernier alinéa - page 5509, colonne de gauche, alinéa 1; figure 3 voir page 5512, colonne de droite, alinéa 3 - page 5513, colonne de gauche, alinéa 1 ---	3

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No

PCT/FR 96/01122

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 8, no. 5, 18 Mars 1994, BETHESDA, MD US, page A785 XP002001077 MCCREADY P.M. ET AL.: "Transient transfection of T cell lines with the murine CD4 promoter and the T cell-specific enhancer" * résumé n. 4554 *</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,9
P,X	<p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 5, 1 Mars 1996, pages 1873-1879, XP002016452 PATRICK SALMON ET AL.: "characterization of a intronless CD4 minigene expressed in mature CD4 and CD8 T cells, but not expressed in immature thymocytes" voir page 1874, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 1874, colonne de droite, dernier alinéa - page 1875, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 1875, colonne de droite, alinéa 3 - page 1876, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,4,8,9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**